



ÖSTERREICHISCHES (51) Int.Cl.³: A61L 015/06
PATENTAMT

A0

(19)

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.369 990

(73) Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR
CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRODUKTE
WIEN, ÖSTERREICH

(54) Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES GEWEBEKLEBSTOFFES

24

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(62) Ausscheidung aus:

(22)(21) Angemeldet am: 1981 07 28, 3337/81

(23) Ausstellungspriorität:

(33)(32)(31) Unionspriorität:

(42) Beginn der Patentdauer: 1982 07 15

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgegeben am: 1983 02 25

(72) Erfinder: REOL HEINZ DR.
WIEN, ÖSTERREICH
SEELICH THOMAS DR.
WIEN, ÖSTERREICH
LINNAU YENDRA DR.
WIEN, ÖSTERREICH

(60) Abhängigkeit:

(56) Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

AT-PS 359652 AT-PS 359653

AT 369 990

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Faktor XIII, Fibrinogen und einem Antibiotikum aus der Gruppe umfassend Aminoglycoside, Betalactame, Polypeptide und Tetracycline.

Es sind bereits aus den AT-PS Nr.359652 und Nr.359653 Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII bekannt, bei welchen bestimmte Konzentrationsverhältnisse an Faktor XIII zu Fibrinogen und gegebenenfalls Albumin eingestellt und die Präparate tiefgefroren oder lyophilisiert werden. Diese Präparate hatten im wesentlichen zufriedenstellende Eigenschaften, nämlich eine hohe Belastbarkeit der Klebungen und eine gute Resorbierbarkeit; jedoch ist es wünschenswert, diese Präparate im Sinne einer antimikrobiellen Wirksamkeit zu verbessern.

Es wurde zwar bereits in der US-PS Nr.2,533,004 sowie von Fellingner unter anderem in der Zeitschrift "Der Tuberkulosearzt" (6/11, 1952) vorgeschlagen, Fibrinogen-Lösungen mit Antibiotika zu versetzen und diese als Wundklebstoff zu verwenden, jedoch ergeben diese erst am Krankenbett zu bereitenden Lösungen keine ausreichende Haltbarkeit und Belastbarkeit der daraus gebildeten Fibringerinnung.

Es ist weiters aus einer Arbeit von Bösch et al., Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, Band 90 (1977), Seiten 63 bis 75, bekannt, in Verbindung mit Knochentransplantaten zur Auffüllung von Knochendefekten ein Fibrinklebesystem anzuwenden, wobei das Fibrin am Ort der Wahl unmittelbar an der Knochenhöhle durch Zusatz von Thrombin zu einer Fibrinogenlösung gebildet wird. Nach Bedarf wurden dabei auch handelsübliche Kombinationspräparate des Neomycins in Pulverform zugesetzt.

Schließlich wurde nach der PCT-Anmeldung 80/00083 vorgeschlagen, ein Fibrinogen-Antibiotikumgel zu bereiten, wobei eine am Krankenbett zu bereitende Mischung von Kryopräzipitat mit Tobramycin und Gentamycin als Antibiotikum zur Anwendung gelangt.

Nach eigenen Versuchen wurde festgestellt, daß die beschriebenen und bekannten Gewebeklebstoffe, die Fibrinogen, Faktor XIII und ein Antibiotikum enthalten, die gewünschte Kombination der Eigenschaften, nämlich eine hohe Belastbarkeit der Klebungen und eine antimikrobielle Wirksamkeit, nicht besitzen, sondern daß zwischen den Antibiotika und dem Faktor XIII eine nachteilige Wechselwirkung eintritt, mit der Folge, daß die Vernetzungsfähigkeit des Fibrinogen stark zurückgeht und die Gerinnungsfähigkeit ungünstig beeinflusst wird. Infolgedessen kommt es zu einer geringeren Festigkeit und Haftfähigkeit des Klebers an den Wund- bzw. Gewebsflächen.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Präparate besteht darin, daß die Abgabe des Antibiotikums an das Gewebe zu schnell erfolgt, so daß die Retardation des Antibiotikums nicht ausreicht, um über längere Zeit zu wirken und eine hohe Wirkstoffabgabe zu erzielen.

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, einen Gewebeklebstoff menschlichen oder tierischen Ursprungs zu schaffen, der die oben angeführten Kombinationseigenschaften erfüllt und eine bessere Wirksamkeit des Antibiotikums garantiert.

Die gestellte Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs definierten Art dadurch gelöst, daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion, gegebenenfalls nach Waschen mit einer Pufferlösung und Zufügen von einem Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktor XIII/g Fibrinogen, von mindestens 500 durch Zugabe von Faktor XIII eingestellt wird, worauf das Antibiotikum zugefügt und das Präparat tiefgefroren oder lyophilisiert wird, oder nach Einstellung des Faktor XIII-/Fibrinogengehaltes das Präparat tiefgefroren oder lyophilisiert und nach Auftauen bzw. Rekonstituieren mit einer antibiotikumhaltigen Lösung vereinigt wird.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform, bei der die fibrinogenhaltige Blutplasmafraktion mit einer Pufferlösung gewaschen wird, wird der Waschprozeß bis zur Erreichung einer Faktor XIII-Konzentration von 200 Einheiten Faktor XIII/g Fibrinogen durchgeführt, worauf Faktor XIII in einer Menge von mindestens 300 Einheiten/g Fibrinogen in Form eines Konzentrates oder Lyophilisates zugeführt wird.

Vorteilhaft wird bei einem tiefgefrorenen Gewebeklebstoff Faktor XIII in einer Menge von mindestens 40 Einheiten/ml verwendet; bei einem lyophilisierten Gewebeklebstoff sollen mindestens

33 Gew.-% Fibrinogen enthalten sein, wobei Faktor XIII in einer Menge von mindestens 170 Einheiten/g Lyophilisat vorhanden ist.

Als Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor kann zweckmäßig ein Vertreter aus der Gruppe Aprotinin, α_2 -Antiplasmin, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin, ϵ -Aminocapronsäure und 5 Tranexamsäure verwendet werden.

Vorteilhaft wird der Gewebeklebstoff als zweikomponentiges Präparat vorbereitet, wobei in der ersten Komponente Faktor XIII, Fibrinogen und der Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor enthalten ist, während in der zweiten Komponente das Antibiotikum, Thrombin und zweiwertiges Calcium enthalten sind.

10 Bevorzugt wird das Antibiotikum in Form eines schwer löslichen Derivates verwendet. Eine Variante dieser Ausführungsform kann darin bestehen, daß neben dem schwer löslichen Derivat auch ein leicht lösliches verwendet wird, gegebenenfalls verteilt in den beiden Komponenten des Gewebeklebstoffes. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, daß das leicht lösliche Derivat schnell abgegeben wird und eine hohe Anfangswirksamkeit gewährleistet, wogegen das schwer lösliche eine 15 lang dauernde Wirksamkeit begründet.

Der erfindungsgemäße Gewebeklebstoff bzw. das Verfahren zu seiner Herstellung werden in den nachfolgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Aus humanem eingefrorenem Frischplasma wurde durch Erwärmen auf 2°C Kryopräzipitat (100 g) gewonnen, durch Zentrifugieren abgetrennt und in einer Pufferlösung, enthaltend 20 Na₃-Citrat, NaCl, Glycin, Glucose, Aprotinin und Heparin bei einem p_H-Wert von 6,5 zweimal gewaschen und der abgetrennte Niederschlag in einer glycinhaltigen Pufferlösung (255 ml) bei einem p_H-Wert von 7,9 gelöst. Es wurde festgestellt, daß in dieser Lösung ein Verhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen von 226 Einheiten Faktor XIII/g Fibrinogen enthalten war. Zur Einstellung des erfindungsgemäß gewünschten Verhältnisses von mehr als 500 E/g Fibrinogen wurde der Lösung ein 25 Faktor XIII-Präparat in Pulverform mit 9000 Einheiten zugesetzt, wodurch das Konzentrationsverhältnis der Lösung nunmehr auf 826 Einheiten Faktor XIII/g Fibrinogen aufgestärkt wurde. Diese Lösung wurde sterilfiltriert; sodann wurden 1,7 g Gentamycin unter sterilen Bedingungen zugefügt, die Mischung in Endbehälter (2,5 ml) abgefüllt, tiefgefroren und lyophilisiert.

Beispiel 2: Die Herstellung der Gewebeklebstoffbasis aus Kryopräzipitat wurde in gleicher 30 Weise vorgenommen wie in Beispiel 1, mit dem Unterschied, daß nach einmaligem Waschen der Kryopräzipitatniederschlag durch Erwärmen auf 37°C verflüssigt und 13600 Einheiten Faktor XIII in Pulverform zugesetzt wurden. Dabei erhielt man ein Verhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen von 967 Faktor XIII-Einheiten/g Fibrinogen. Der Lösung wurde als Antibiotikum 5,67 g 7-[(Thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansäure zugefügt. Die so erhaltene Suspension wurde in Endbehälter (1 ml) 35 gefüllt und tiefgefroren. Faktor XIII ist in dem abgefüllten Präparat in einer Menge von 87 E/ml enthalten.

Die Applikation der nach den Beispielen 1 und 2 hergestellten Gewebeklebstoffe erfolgt vorteilhaft dadurch, daß die aufgetaute bzw. rekonstituierte Mischung mit Thrombin und Calciumchlorid gemischt und auf das zu verbindende Gewebe aufgetragen wird. Es ist auch möglich, die beiden 40 Komponenten getrennt auf das zu verbindende oder auszufüllende Gewebe aufzubringen.

Beispiel 3: Das Verfahren nach Beispiel 1 wurde bis auf die Zugabe des Antibiotikums wiederholt. Der gewaschene Niederschlag wurde nach Auflösen in Pufferlösung sterilfiltriert, in Endbehälter (2,5 ml) abgefüllt, tiefgefroren und lyophilisiert, womit die erste Komponente des erfindungsgemäßen Gewebeklebstoffes lagerfähig gemacht wurde. Die zweite Komponente wurde vor der Appli- 45 kation aus einer Lösung von Thrombin und Calciumchlorid durch Zugabe von 7-[(Thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansäure (30 mg/ml) bereitet.

Beispiel 4: Die Vorgangsweise nach Beispiel 2 wurde wiederholt, wobei nach Auflösen des Kryopräzipitatniederschlags Gentamycin (1,89 g) zugegeben, die Lösung in Endbehälter (1 ml) abgefüllt und tiefgefroren wurde. Damit liegt die erste Komponente des erfindungsgemäßen Klebers 50 in lagerfähiger Form vor. Die zweite Komponente enthaltend 30 mg 7-[(Thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansäure pro ml einer Calciumchlorid-Thrombinlösung wurde vor der Applikation bereitet.

An Stelle des nach den Beispielen 1 bis 4 zugefügten Aprotinins können als Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor einer oder mehrere der folgenden: α_2 -Antiplasmin, α_2 -Makroglo-

bulin, α_1 -Antitrypsin, ϵ -Aminocaprinsäure und Tranexamsäure verwendet werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten Gewebeklebstoffe besitzen eine generelle Anwendbarkeit zum nahtlosen Verbinden von menschlichem oder tierischem Gewebe oder Organen zur Wundversorgung und Blutstillung bei wesentlich verbesserter antimikrobieller Wirksamkeit.

Die verbesserten Klebeeigenschaften bei in gleicher Weise verbesserter antimikrobieller Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Gewebeklebstoffe ergibt sich aus den folgenden tabellarisch zusammengefaßten Vergleichsbeispielen; hierbei wurde der Vernetzungsgrad erfindungsgemäßer Gewebeklebstoffe mit erhöhtem Faktor XIII/Fibrinogen-Verhältnis dem Vernetzungsgrad bekannter Gewebeklebstoffe ohne erhöhtes Faktor XIII/Fibrinogen-Verhältnis gegenübergestellt, jeweils bei Verwendung verschiedener Antibiotika. Der α -Vernetzungsgrad ist nach der Natriumlaurylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode bestimmt, die derart durchgeführt wird, daß nach dem Vermischen des Gewebeklebstoffes mit dem gleichen Volumen einer Lösung, enthaltend 40 μ Mol CaCl₂ und 15 NIH-Einheiten (US National Institute of Health-Einheiten) Thrombin pro ml, die Mischung bei 37°C inkubiert wird. Der α -Vernetzungsgrad wird nach Stoppen der Reaktion und reduktiver Spaltung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken durch Zugabe eines Gemisches von Harnstoff, Natriumdodecylsulfat und β -Mercaptoäthanol durch Gelelektrophorese bestimmt.

Im weiteren Teil der Tabelle wurde die Clotfestigkeit im Thrombelastographen eines erfindungsgemäßen Gewebeklebstoffes einem bekannten gegenübergestellt, wobei Gentamycin als Antibiotikum zugegeben wurde.

Schließlich enthält die Tabelle Reißfestigkeits-Vergleichswerte eines erfindungsgemäßen Gewebeklebstoffes mit einem bekannten, bei Verwendung mit Gentamycin als Antibiotikum.

Fibrin α -Vernetzung (bei 37°C nach 60 min)

Antibiotikum-zusatz	erfindungsgemäßer Gewebeklebstoff mit erhöhtem Faktor XIII-Gehalt > 500 E/g Fbg.	Gewebeklebstoff ohne erhöhtem Faktor XIII-Gehalt
Gentamycin	70%	30%
Neomycin	41%	21%
Fosfomycin	47%	24%
Azlocillin	66%	42%
Doxycyclin	65%	26%
Cefoxitin	54%	44%

Clotfestigkeit im Thrombelastographen
(37°C-60 min) ϵ = Elastizitätsmodul

Gentamycin	1150	426
------------	------	-----

Reißfestigkeit in g/cm²
(37°C-30 min)

Gentamycin	1283	999
------------	------	-----

Schließlich wurde noch ein Vergleichsbeispiel bezüglich der Antibiotika-Abgabe aus einem nach Beispiel 4 hergestellten Gewebeklebstoff durchgeführt, wobei in einem in-vitro-Versuch nach 72 h bereits 85% des Gentamycins aus einem mit diesem Klebstoff hergestellten Clot abgegeben wurden. Nach 96 h wurde eine Abgabe von Gentamycin nicht mehr festgestellt, während die 7-[(Thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansäure noch nach 8 Tagen nachweisbar war.

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Faktor XIII, Fibrinogen und einem Antibiotikum aus der Gruppe umfassend Aminoglycoside, Betalactame, Polypeptide und Tetracycline, dadurch gekennzeichnet, daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion, gegebenenfalls nach Waschen mit einer Pufferlösung und Zufügen von einem Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktor XIII/g Fibrinogen, von mindestens 500 durch Zugabe von Faktor XIII eingestellt wird, worauf das Antibiotikum zugeführt und das Präparat tiefgefroren oder lyophilisiert wird, oder nach Einstellung des Faktor XIII-/Fibrinogengehaltes das Präparat tiefgefroren oder lyophilisiert und nach Auftauen bzw. Rekonstituieren mit einer antibiotikumhaltigen Lösung vereinigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die fibrinogenhaltige Blutplasmafraktion mit einer Pufferlösung gewaschen wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Waschprozeß bis zur Erreichung einer Faktor XIII-Konzentration von 200 Einheiten Faktor XIII/g Fibrinogen durchgeführt wird, worauf Faktor XIII in einer Menge von mindestens 300 Einheiten/g Fibrinogen in Form eines Konzentrates oder Lyophilisates zugefügt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor aus der Gruppe Aprotinin, α_2 -Antiplasmin, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin, ϵ -Aminocaprinsäure und Tranexamsäure verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gewebeklebstoff als zweikomponentiges Präparat hergestellt wird, wobei in der ersten Komponente Faktor XIII, Fibrinogen und der Plasmin-Inhibitor bzw. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor enthalten ist, während in der zweiten Komponente das Antibiotikum, Thrombin und zweiwertiges Calcium enthalten sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antibiotikum in Form eines schwer löslichen Derivates verwendet wird.

